

RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.

Estratto dal vol. XXVII, serie 6^a, 1^o sem., fasc. 9. - Roma, maggio 1938-xvi

Coltura in serie del "Trypanosoma brucei"
nell'embrione di pollo

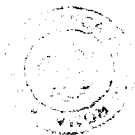
NOTA

DI

E. BIOCCA



Atto
B
57
66

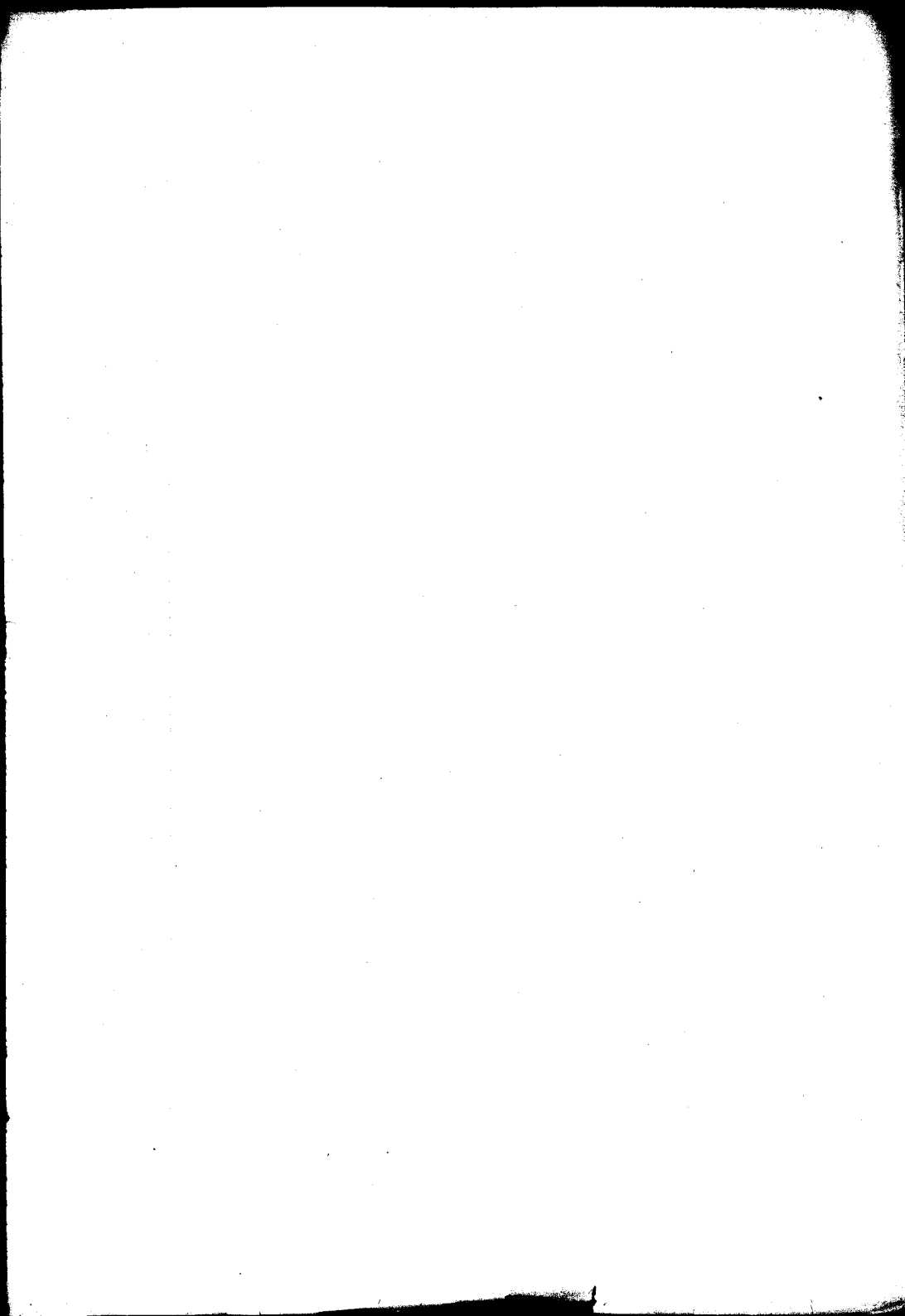


ROMA

DOTT. GIOVANNI BARDI

TIPOGRAFO DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

1938-xvi



Microbiologia. — *Coltura in serie del «Trypanosoma brucei» nell'embrione di pollo*⁽¹⁾. Nota di E. BIOCCA, presentata⁽²⁾ dal Socio D. DE BLASI.

Sono note le difficoltà di coltivare i protozoi in genere. Tali difficoltà si presentano in maniera evidentissima, quando si tratta di coltivare in serie i Tripanosomi e specialmente i Tripanosomi patogeni.

Esistono, è vero, numerosi terreni preparati a tale scopo, quali i classici di MC. NEALE e NOVY, PONSELLE, NÖLLER, N. N. N., quello di GAILLARD e il più recente di BONACCI, ma in realtà, mentre i Tripanosomi non patogeni si sviluppano spesso in maniera rigogliosa, ciò non avviene col *Trypanosoma brucei*, *gambiense*, *rhodesiense*.

Infatti, anche in base ai lavori di questi ultimi anni del PRATES, LWOFF, PACKGHANIAN, RAZGHA, FRANCHINI, REICHENOW, ARNAUD, PANKIER, BRUTSAERT e HENRARD, ecc., ed i recentissimi del CASTELLANI e JACONO, si è autorizzati a concludere che, se pure qualche volta si sia riusciti ad ottenere culture trapiantabili in serie, tali culture molto spesso si sono esaurite spontaneamente e hanno perduto quasi sempre e in poco tempo la virulenza. In tutti gli Istituti, quindi, tali ceppi di Tripanosomi vengono mantenuti e trapiantati da animale in animale.

Convinti che i Tripanosomi patogeni hanno bisogno, per crescere e riprodursi, di trovarsi in un essere vivente, abbiamo pensato di coltivarli nell'embrione di pollo.

Ci siamo serviti di un ceppo di *Trypanosoma brucei* fornitoci gentilmente dal prof. Vanni, Direttore dell'Istituto di Parassitologia della R. Università di Roma.

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto d'Igiene della R. Università di Roma.

(2) Nella seduta del 1° maggio 1938.

Siamo riusciti a far sviluppare in cultura rigogliosa i Tripanosomi nel torrente circolatorio dell'embrione. Abbiamo adoperato uova fecondate e tenute in incubazione nel termostato a 38°-39° C. da almeno nove giorni. Osservando per transilluminazione, abbiamo segnato sul guscio, con un lapis, la circonferenza della camera d'aria. Un centimetro sopra alla linea da noi tracciata, dopo aver disinfettato localmente il guscio con tintura di iodio ed alcool, abbiamo praticato un piccolo foro con uno spillo. Per quanto è possibile, è bene perforare il guscio senza lacerare la membrana sottostante. Con una pipetta molto affilata si aspirano un paio di gocce di sangue di cavia malata con Tripanosomi in circolo, e, appoggiandola sopra il foro praticato nel guscio, si lacera delicatamente la «membrana testacea» per modo che il sangue viene aspirato e penetra lentamente nell'interno dell'uovo. Il foro si chiude con qualche goccia di cera fusa al momento, quindi l'uovo infestato si rimette subito in termostato.

Abbiamo osservato che il periodo migliore per ottenere rigogliose culture è compreso tra il nono e il quattordicesimo giorno di incubazione in termostato. Tre giorni dopo la semina, già si osservano numerosi Tripanosomi in circolo nell'embrione, che aumentano il quarto giorno e il quinto sono in cultura ricchissima (fino a trenta e quaranta per campo microscopico).

Questi Tripanosomi hanno mantenuta la virulenza verso la cavia, alla quale li abbiamo iniettati, provocandone la morte dopo qualche giorno dall'inoculazione. Dalla cavia abbiamo di nuovo infestato, con la stessa tecnica, gli embrioni di pollo. Dalle uova, così infestate, abbiamo fatto passaggi in altre uova.

Stiamo eseguendo contemporaneamente tre serie di trapianti che sono stati fatti, tutte le volte, da otto in otto uova.

I serie: Cavia- Uovo- Cavia- Uovo- Uovo- Uovo- Uovo- Uovo- Uovo...

II » : Cavia- Uovo- Uovo- Uovo- Uovo- Uovo...

III » : Cavia- Uovo- Uovo...

Ad ogni passaggio si è eseguito il controllo della virulenza nelle cavie. Finora questa si è mantenuta in tutti i casi costante e i caratteri morfologici dei Tripanosomi si sono riscontrati identici nella cavia e nell'embrione.

Si è avuto sviluppo rigoglioso solo nelle uova fecondate, con embrione vivo. Qualche uovo, privo assolutamente di Tripanosomi, aveva l'embrione macerato, per ragioni che, probabilmente, vanno ricercate in questioni di tecnica riguardanti il tempo di incubazione delle uova, il punto di inoculazione e la quantità di sangue iniettato; questioni che stiamo risolvendo. Tutte le modalità della tecnica un po' delicata, saranno descritte esattamente in un prossimo lavoro.

Ci è parso interessante vedere come si comportino anche i volatili adulti verso questo ceppo di *Trypanosoma*. Abbiamo perciò tentato d'infestare sperimentalmente tre colombi, praticando ad essi tre inoculazioni nei muscoli pettorali di cc. 1 e 1,5 di sangue di cavia ricchissimo di *Tripanosomi*, a distanza di sette giorni l'una dall'altra. Tali tentativi sono sempre falliti. Analoghe esperienze stiamo eseguendo sui polli, finora con lo stesso risultato. Sembrerebbe quasi che solo tra il nono e il quattordicesimo giorno di incubazione sia possibile infestare le uova e che, successivamente, compaiano nell'embrione in via di sviluppo, le proprietà difensive che possiede l'adulto.

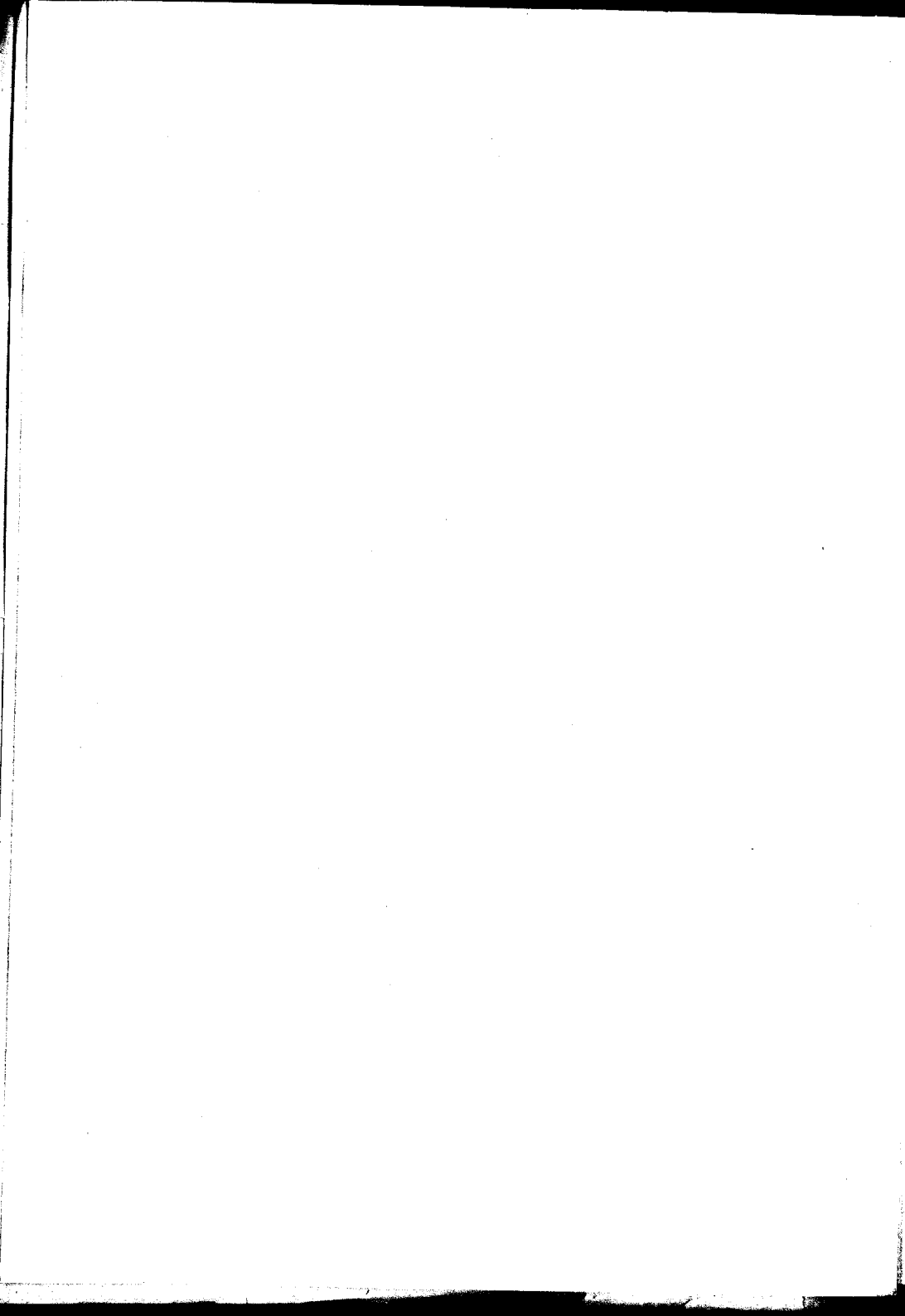
Una osservazione da noi fatta e che ci sembra molto interessante di porre in evidenza è la seguente: mentre non si trovano più *Tripanosomi* nella cavia e nell'embrione poco dopo la morte provocata dagli stessi *Tripanosomi*, al contrario, mantenendo la capsula Petri, dove abbiamo versato e ucciso l'embrione di pollo infestato, a temperatura ambiente o meglio in ghiacciaia, è possibile trovare i *Tripanosomi* vivi e mobili anche dopo parecchi giorni dall'apertura dell'uovo (oltre otto giorni). Comportamento che ricorda quello osservato dal CASTELLANI e JACONO della sopravvivenza del *Try. gambiense* (*Castellanella*) nel sangue stesso defibrinato dell'animale ammalato.

Ci proponiamo pertanto di seguire altri passaggi in serie nelle uova controllando i caratteri morfologici e di virulenza del *Trypanosoma*, volta per volta, e di studiare, dato il risultato incoraggiante dei primi esperimenti, la conservabilità di tali microrganismi in provette in cui sia stato aperto l'uovo stesso embrionato.

Infine, poichè questi risultati sono molto promettenti, pensiamo di estendere le nostre ricerche ad altri protozoi fino ad oggi ritenuti incoltivabili.

LETTERATURA.

- ARNAUD, « Ann. Soc. Belge de Méd. Trop. », vol. XIV, 1934.
BONACCI H., « Rev. Inst. Bacteriol. », Buenos Aires, vol. VI, 1934.
BRUTSAERT P., HENRARD C., « Ann. Soc. Belge de Méd. Trop. », vol. XVI, 1936.
CASTELLANI A. e JACONO I., « Riv. Parasit. », vol. VII, 1937.
FRANCHINI G., « Bull. Soc. Path. Exot. », vol. XVII, 1924.
GAILLARD H., « Ann. Parasit. », vol. VII, 1929.
LWOFF M., « Bull. Soc. Path. Exot. », vol. XXII, 1929.
PACRCHANIAN A., « Science », vol. LXXX, 1934.
PANNIER E., « C. R. Soc. Biol. », vol. CXXII, 1936.
PRATES M., « Rapp. defn. Comm. Intern. Tryp. hum. Soc. des Nations, C. II. », 629, Genève, 1928.
RAZGHA A., « Zeitschr. f. Parasitenk. », vol. II, 1929.
REICHENOW E., « Arch. f. Schiff- u. Trop. Hyg. », vol. XXXVIII, 1934.



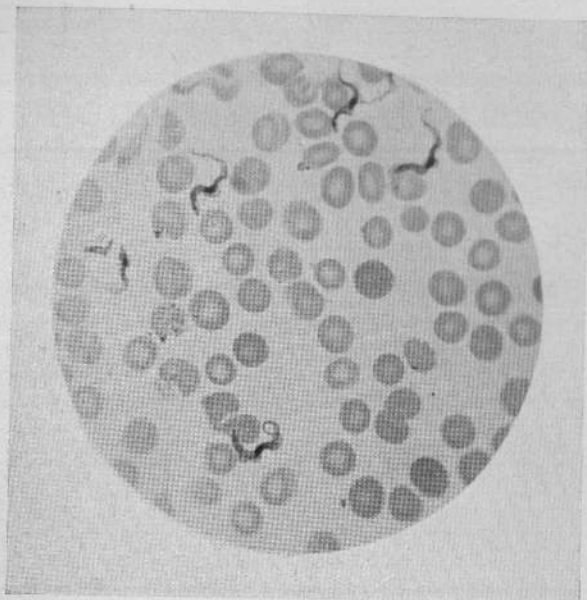


Fig. 1 - Sangue di cavia con *Trypanosoma brucei*.

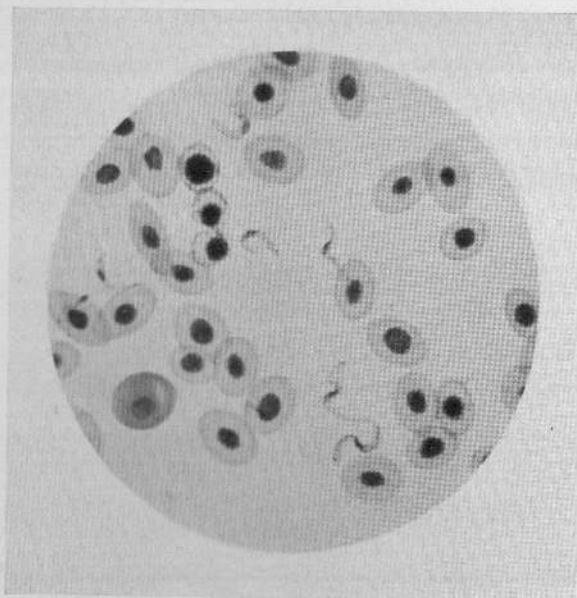


Fig. 2 - Sangue prelevato dal cuore di embrione di pollo con *Trypanosoma brucei*.

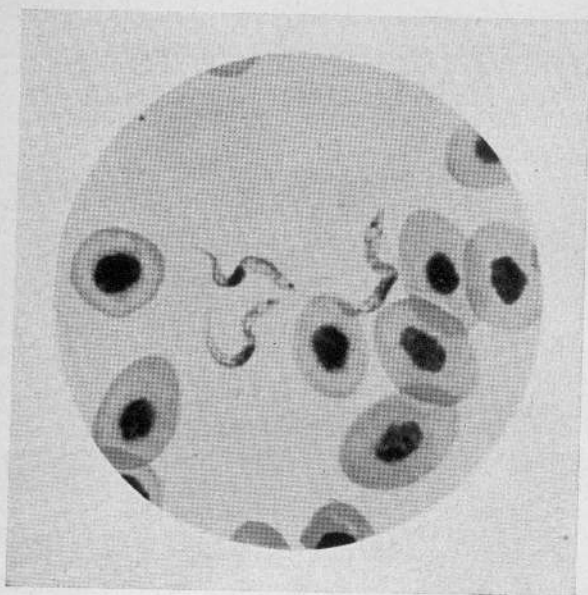


Fig. 3 - Sangue dei vasi dell'allantoide dell'embrione di pollo con *Trypanosoma brucei*.

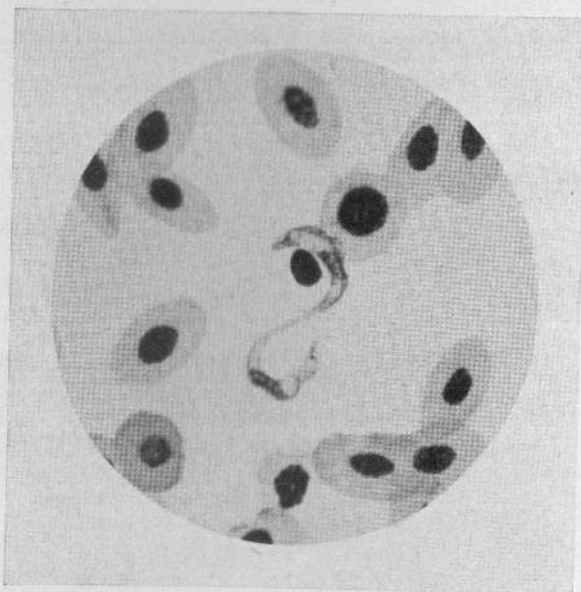


Fig. 4 - Sangue dei vasi dell'allantoide dell'embrione di pollo con forme in divisione di *Trypanosoma brucei*.

325434

